

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 540号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	岩 泉 守 哉		
論文題目	<p>Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer (大腸癌においてヒト Sgo1 の低下は染色体不安定性を誘導する)</p>		

博士(医学) 岩 泉 守 哉

論文題目

Human Sgo1 down regulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer

(大腸がんにおいてヒト Sgo1 の低下は染色体不安定性を誘導する)

論文内容の要旨

[はじめに]

大腸癌の発育進展にはmicrosatellite instability (MIN)およびchromosomal instability (CIN:染色体不安定性)を示す経路が存在する。特にCINを示す散発性大腸癌は約85%を占め、紡錘体形成チェックポイントの異常や染色体分離異常が原因であると考えられている。一方、正確な染色体分離が行われる上で重要な役割を果たす分子として近年同定されたヒトシュゴシン(hSgo1)は大腸癌の発癌および発育進展過程において何らかの関わりが推測されているが詳細な報告はこれまでにない。そこで今回我々は大腸癌におけるhSgo1の分子病理学的変化およびそれが大腸癌におよぼす影響を検討した。

[材料ならびに方法]

大腸癌患者の手術材料から得られた腫瘍部およびその近傍の正常部からDNA、RNA、タンパク質を抽出しPCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法、ダイレクトシーケンシング法、QRT-PCR法およびウェスタンブロット法によりSGOL1遺伝子変異検索ならびにhSgo1発現解析を行った。異数体の確認にはFluorescence *in situ* hybridization (FISH)法ならびにFluorescence-activated cell sorting (FACS)法を用い、得られた結果で臨床病理学的検討を行った。さらに臨床病理学的検討から得られた結果を踏まえてhSgo1 short hairpin RNA (shRNA)発現ベクターを作製し大腸癌細胞株 HCT116 にリポフェクション法で導入後、FACS法、FISH法、生細胞の経時的観察、および4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)による蛍光免疫染色法で大腸癌細胞株におけるhSgo1の発現低下の影響を検討した。

[結果]

30名の例の大腸癌症例において、SGOL1遺伝子にアミノ酸が変化するvariantは認められなかった。46名の大腸癌症例でのQRT-PCR法およびウェスタンブロット法での解析より、腫瘍部では近傍の正常部に比べhSgo1の発現が有意に低下していた($P=0.032$)。さらにQRT-PCRの結果からhSgo1 mRNAの腫瘍部/正常部比(T/N比)が0.5未満の群(46例中22例)ではT/N比が0.5以上の群(46例中24例)に比べ、癌が左側大腸に局在し($P=0.012$)、FISH法での観察では染色体数の変化に富んでいた。

以上の結果を踏まえ、hSgo1が低下することによる大腸癌細胞の影響を調べるためにhSgo1 shRNA発現ベクターを作製後、大腸癌細胞株HCT116に導入し、control shRNA発現ベクター導入HCT116細胞と比較した。その結果、hSgo1 shRNA発現ベクター導入細胞においてFACS法ではG2/M arrestが認められ、FISH法では異数体が認められ、DAPIによる蛍光染色ではmicronuclei陽性細胞や2核細胞および中心体数の異常が認められた。また、生細胞の経時的観察ではM期の時間が長く、mitotic catastropheのほか異常細胞質分裂、2核細胞の出現、mitotic slippageが高頻度に観察された。以上よりhSgo1 の低下によるCINの誘導が確認された。

[考察]

今回、以下3点の知見が得られた。(1)大腸癌患者の腫瘍部のhSgo1の発現はmRNAおよびタンパク質レベルで低下していた。(2)hSgo1 mRNAのT/N比の低い大腸癌は左側大腸に局在し、染色体数の変化

に富んでいた。(3)*in vitro*でHCT116におけるhSgo1の発現を低下させたところ、CINが誘導された。以上のことは消化器癌におけるhSgo1の変化とその関与についての初めての報告である。

左側大腸癌と右側大腸癌での様々な面における違いに関してはこれまでに多くの報告があり、中でもCINの特徴を示す大腸癌は左側大腸に局在する傾向があることは複数報告されている。我々の検討で、hSgo1 T/N比の低い癌は左側大腸に局在することから、hSgo1 T/N比の低い癌とCINとの関連が高いと推測され、FISH法でこの関連が確認された。さらに*in vitro*でHCT116におけるhSgo1のknockdownがCINを誘導したことから、hSgo1の低下は大腸癌でのCINに大きく関与すると考えられた。

[結論]

腫瘍部におけるhSgo1の発現が正常部に比べて低下している大腸癌は臨床病理学的にCINの特徴を備えており、hSgo1の発現を低下させることでCINを誘導することが示唆された。このことは、今後大腸癌の発育進展においてCINが誘導される分子機構を考える上で重要な知見であると思われる。

論文審査の結果の要旨

大腸癌の発生、進展は多段階の遺伝子異常の蓄積により生ずると考えられており、その異常はchromosomal instability (CIN:染色体不安定性)、micro satellite instability (MIN)の2つに大きく分けられる。このうち散発性大腸癌では85%にCINが認められ、紡錘体形成チェックポイントや染色体分離の異常がその原因と考えられている。ヒトシユゴシン(hSgo1)は染色体制御を守る重要な分子として同定されたが、大腸癌の発癌及び発育進展過程における関与についての詳細な報告はない。そこで申請者は、大腸癌におけるhSgo1の分子病理学的変化とそれが大腸癌に及ぼす影響を検討した。

大腸癌患者46例の手術時に得られた腫瘍部及びその近傍の正常部の組織検体からDNA、RNA、タンパクを抽出し材料とした。SGOL1遺伝子変異は、PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP)法、ダイレクトシーケンス法により検索した。hSgo1発現は、QRT-PCR法、ウェスタンブロット法により解析した。染色体異数体の確認は、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法ならびにFluorescence-activated cell sorting (FACS)法を用い、得られた結果で臨床病理学的検討を行った。さらに大腸癌細胞株(HCT116)にhSgo1 short hairpin RNA(shRNA)を導入後、FACS法、FISH法、生細胞の経時的観察、及び4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)による蛍光免疫染色法で大腸癌細胞株におけるhSgo1の発現低下の影響を検討した。

結果としては、

1. SGOL1遺伝子変異検索では、30例の大腸癌症例においてミスセンス変異は認められなかった。
2. hSgo1発現解析では、46名の大腸癌症例でのQRT-PCR法及びウェスタンブロット法により腫瘍部での発現は近傍の正常部に比し有意な低下を認めた($P=0.032$)
3. QRT-PCR法によるhSgo1 mRNA量の(腫瘍部/正常部)比が0.5未満の群では、0.5以上の群に比べ癌が左側大腸に局在し($P=0.012$)、FISH法での観察では染色体数の分布幅が大きかった。
4. 大腸癌細胞株HCT116においてhSgo1 shRNA発現ベクター導入細胞では、hSgo1発現抑制の影響として、FACS法ではG2/M期停止が認められ、FISH法では異数体が認められた。DAPIによる蛍光染色ではmicronuclei陽性細胞や2核細胞及び中心体数の異常が認められた。また、生細

胞の経時的観察では M 期の時間が長く、mitotic catastrophe の他に異常細胞質分裂、2 核細胞の出現、mitotic slippage が高頻度に観察され、CIN の誘導が確認された。

以上の結果から、腫瘍部における hSgo1 の発現が正常部に比べて低下している大腸癌は臨床病理学的に CIN の特徴を備えていること、hSgo1 の発現を低下させることで CIN が誘導されることが示唆された。

審査委員会では、こうした hSgo1 の発現異常の解析結果は、今後大腸癌の発育進展において CIN が誘導される分子機構を考える上で重要な知見であると考え高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞の DNA 量のヒストグラムの分布幅と臨床病理学との関連について
- 2) QRT-PCR 法による hSgo1 mRNA (腫瘍部/正常部) 比のカットオフ値の設定について
- 3) hSgo1 のアイソフォームについて
- 4) 染色体不均等分裂後の細胞の運命について
- 5) オーロラキナーゼによる染色体制御について
- 6) 他の紡錘体形成チェックポイントと大腸癌発現の関係について
- 7) がん遺伝子のプロモーター領域のエピジェネティックな変化について
- 8) 大腸癌の幹細胞レベルにおける CIN について
- 9) 紡錘体形成チェックポイントに関連する遺伝子に対するノックアウトマウスにおける発がんについて
- 10) RNAi の方法論について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 大西 一功

副査 三浦 直行 前川 真人